



УДК 577.152.34'14.088.5 : 543.51

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕИНАЗ

*Александров М. Л., Гондратьев В. М., Гуснер Ю. С.,
Миргородская О. А., Подтележников А. В., Фридлянский Г. В.*

*Институт аналитического приборостроения ИТО
Академии наук СССР, Ленинград*

При определении субстратной специфичности протеиназ возникает проблема выбора количественного критерия этого параметра. Это необходимо как в прикладных исследованиях, так и в работах по установлению механизма действия ферментов. Таким параметром является константа Михаэлиса (K_m), которую можно реально определять лишь для относительно простых субстратов по изменению концентрации одного из компонентов реакции.

Исследование кинетики ферментативного гидролиза для более сложных объектов связано с необходимостью фракционирования и идентификации продуктов гидролиза, что осуществимо лишь с привлечением трудоемких и неуниверсальных методов [1]. Кроме того, значения K_m даже для таких высокоспецифичных протеиназ, как трипсин, при гидролизе различных низкомолекулярных соединений варьируются в широких (до 2—3 порядков) пределах [1, 2]. Еще большие трудности возникают при исследовании ферментов с более широкой специфичностью: так, химо-трипсин можно было бы отнести к высокоспецифичным ферментам, поскольку значения K_m , вычисленные для низкомолекулярных субстратов, близки к значениям K_m для трипсина, что явно противоречит эксперименту [2]. Таким образом, значения K_m , вычисленные по данным для низкомолекулярных субстратов, нельзя считать критерием специфичности для высокомолекулярных субстратов.

В настоящей статье мы хотим показать, что более удобным альтернативным способом определения специфичности является масс-спектрометрический анализ компонентов реакционных смесей с использованием «мягких» методов ионизации [3, 4], особенно метода ЭРИАД* [5, 6]. Во-первых, ранее нами было показано [5, 6], что для этого метода возможен выбор условий, при которых в масс-спектре представлены преимущественно линии квазимолекулярных ионов компонентов реакционных смесей. Во-вторых, и это наиболее существенно, метод позволяет непрерывно вводить в масс-спектрометрию жидкую реакционную смесь и регистрировать ее качественный состав непосредственно в ходе гидролиза.

В качестве исследуемых протеиназ нами были выбраны трипсин, химо-трипсин и протеиназа I из *Aspergillus terricola*, а в качестве тест-объекта — наиболее часто используемая для этих целей В-цепь инсулина [2]. Ниже приведена структура В-цепи (3492 Да), верхними стрелками указаны места расщепления трипсином, нижними — химо-трипсином, стрелками в скобках — мишорные точки расщепления по данным монографии [2]:



* ЭРИАД — экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении.

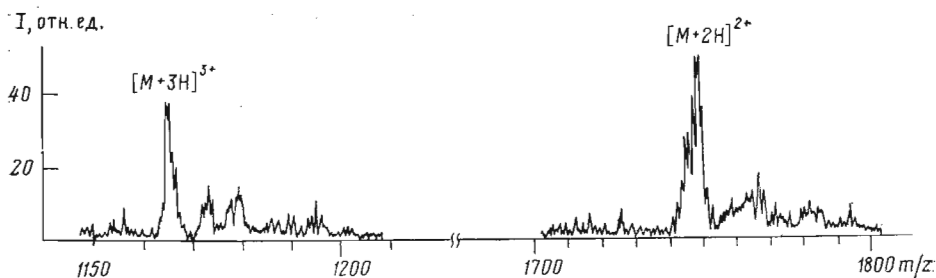


Рис. 1. Масс-спектр реакционной смеси при гидролизе В-цепи инсулина химотрипсином, $t = 0$ мин. Наиболее интенсивные линии спектра — MH_2^{2+} (m/z 1747) и MH_3^{3+} (m/z 1165). Концентрация субстрата 10^{-4} М; I — интенсивность линий масс-спектра в относительных единицах

Для протеиназы I такие данные отсутствуют, известны лишь данные по гидролизу некоторых низкомолекулярных субстратов [7].

Проверку гомогенности ферментов и субстрата осуществляли как с помощью хроматографа «Милихром», так и в ходе изучения кинетики реакции масс-спектрометрическим методом. Ферментолиз проводили в 5 мМ трис- H_2SO_4 (рН 8,0), что соответствует оптимуму действия всех исследованных ферментов [1, 2, 7]. На рис. 1 показан масс-спектр реакционной смеси (гидролиз химотрипсином) в момент времени $t = 0$, позволяющий анализировать чистоту В-цепи в смеси: зарегистрированы квазимолекулярные ионы MH_2^{2+} , MH_3^{3+} , MH_2Na^{3+} , $MH_3(H_2O)^{3+}$, никаких других линий в масс-спектре в диапазоне массовых чисел выше 200 а.е.м. не содержится.

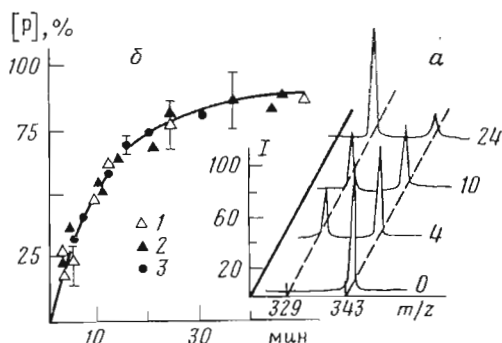
Кинетические исследования ферментативных реакций на масс-спектрометрах с «мягкой» ионизацией (в том числе и ЭРИАД) являются неколичественными и тем не менее могут быть проведены с достаточно высокой точностью [3, 4, 6]. На рис. 2 приведена кинетическая кривая трипсинолиза метилового эфира тозиларгина, определенная двумя способами — масс-спектрометрически и спектрофотометрически; видно, что кривые хорошо совпадают. Аналогичные результаты получены с другими низкомолекулярными субстратами. Таким образом, метод ЭРИАД позволяет изучить кинетику ферментативного гидролиза, а также определить состав конечных продуктов при «бесконечном» времени гидролиза, т. е. сравнить специфичность протеиназ на любом высокомолекулярном субстрате.

На рис. 3а, б показаны результаты анализа методом ЭРИАД реакционных смесей, полученных при гидролизе В-цепи инсулина трипсином и химотрипсином соответственно. Как и следовало ожидать [1, 2, 8], трипсин преимущественно расщепляет связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина, а химотрипсин — в основном карбоксамидные связи ароматических аминокислот, а также лейцина, лизина, гистидина, аргинина, аспарагина, серина, глутамина.

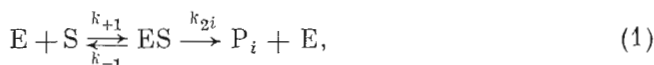
Подобным же образом оценена специфичность протеиназы I (основной компонент Террилитин отечественного производства). Наибольшее количество разрывов наблюдается по карбоксильным связям основных в некоторых ароматических аминокислот, хотя значения K_m , полученные в работе [7] для низкомолекулярных субстратов, в состав которых входят эти аминокислоты (10^{-2} М), и условия проведения опыта (концентрация В-цепи 10^{-4} М) говорят о том, что гидролиз не должен был бы происходить. Неожиданным при гидролизе протеиназой I, так же как и при гидролизе химотрипсином, оказалось присутствие продуктов, которые должны были бы гидролизироваться дальше, например пептидов LYLV и ALYL при наличии пептида ALY. Наблюдаемый эффект может быть связан либо с неколичественностью метода анализа, либо с ингибированием действия протеиназы продуктами гидролиза.

Определяемый масс-спектрометрическим методом набор продуктов при «бесконечном» времени гидролиза дает качественное представление о спе-

Фиг. 2. Исследование кинетики гидролиза метилового эфира тозиларгинина с помощью масс-спектрометрии (а; цифры справа соответствуют времени снятия спектра в минутах) и сопоставление кинетических кривых, полученных с помощью масс-спектрометрии (1, 2 — две серии измерений) и спектрофотометрически (3) (б). Концентрация субстрата в смеси 10^{-3} М



цифичности разрыва пептидных связей в высокомолекулярном субстрате. Для получения количественного критерия специфичности запишем схему реакций ферментативного гидролиза в простейшем виде (как станет ясно из дальнейшего, выбор конкретной схемы несуществен):



где k_{2i} — каталитическая константа скорости образования i -го продукта P_i из полного набора возможных продуктов. Соответствующая система кинетических уравнений

$$\begin{cases} \frac{d[ES]}{dt} = - \left\{ k_{-1} + k_{+1}[S] + \sum_i^N k_{2i} \right\} [ES] + k_{+1}[E]_0[S] \equiv - \frac{[ES]}{\tau} + f(t) & (2a) \\ \frac{d[P_i]}{dt} = k_{2i}[ES] & (2b) \end{cases}$$

с начальными условиями: $P_i(0) = 0$, $[E] = [E]_0$, $[S] = [S]_0$ при $t = 0$, а постоянная времени $\tau = \{k_{+1}[K_m + [S]]\}^{-1}$ по свойству линейных неоднородных уравнений первого порядка определяет характерное время реакций по схеме (1); соответствующая схеме (1) константа Михаэлиса

$$K_m = \frac{\left(k_{-1} + \sum_i^N k_{2i} \right)}{k_{+1}}$$

Интегрируя уравнение (2б)

$$[P_i]_{\infty} = k_{2i} \int_0^{\infty} [ES] dt \quad (3)$$

и оценивая интеграл в уравнении (3) аналогично работе [9] в приближении стационарной кинетики (это предположение также используется для простоты оценки и не является существенным), получаем

$$[P_i]_{\infty} \simeq k_{2i} \int_0^{\tau} [ES] dt = k_{2i} k_{+1} [E]_0 [S]_0 \tau^2. \quad (4)$$

Введем критерий δ_i относительной специфичности как относительный выход по данному направлению гидролиза:

$$\delta_i = \frac{[P_i]_{\infty}}{\sum_i [P_i]_{\infty}}. \quad (5)$$

Используя формулу (4), получаем

$$\delta_i = \frac{k_{2i}}{\sum_i k_{2i}}. \quad (5a)$$

ной пептидной связи, точно регистрируемое масс-спектрометрическим методом.

Авторы благодарят М. А. Большакову (ВНИТИАФ, Ленинград) за любезно предоставленный образец протениназы I, М. А. Грачева (Лимнологический институт, Иркутск) за обсуждение результатов. Особую благодарность авторы выражают Б. В. Розынову (ИБХ АН СССР, Москва) за ценные предложения по постановке экспериментальной работы и обсуждение результатов опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Пер. с англ. М.: Мир, 1966. С. 330—386.
2. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. С. 127—153.
3. Burlingame A. L., Baillie T. A., Derrick P. Y. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. № 5. P. 165R — 211R.
4. Viemann K., Martin S. A. // *Mass. spectrom. rev.* 1987. V. 6. № 1. P. 12—40.
5. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. № 5. С. 700—704.
6. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Грачев М. А., Кнорре В. Г., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкуров В. А. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. № 5. С. 705—708.
7. Селезнева А. А., Большакова М. Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1985. Т. 22. № 1. С. 3—11.
8. Smyth O. G. // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 11. P. 214—231.
9. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979. С. 312.

Поступило в редакцию
18.II.1987
После доработки
7.XII.1987

MASS-SPECTROMETRIC DETERMINATION OF THE PROTEINASE SPECIFICITY

ALEXANDROV M. L., KONDRATYEV V. M., KUSNER Yu. S.,
MIRGORODSKAYA O. A., PODTELEZHNIKOV A. V., FRIDLANDSKY G. V.

*Institute of Analytical Instrument Construction,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Analysis of methods of the proteinase substrate specificity determination revealed that Michaelis constants found from the rates of hydrolysis of small synthetic substrates cannot be a good measure of selectivity, especially for proteinases of broad specificity used for hydrolysis of substrates of high molecular mass with multiple cleavage sites. Mass-spectrometric studies (ERIAD) of the hydrolysis of the insulin B chain with trypsin, chymotrypsin, and proteinase I showed that monitoring of the reaction mixtures by means of this technique gives more reliable information on the selectivity of proteinase towards high-molecular substrates.

Технический редактор Рудницкая А. В.

Сдано в набор 21.03.88 Подписано к печати 27.04.88 Т-08878 Формат бумаги 70×103¹⁶
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,8 тыс. Уч.-изд. л. 14,9 Бум. л. 4,5
Тираж 919 экз. Зак. 1436

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6